



## **TRABAJO DE FIN DE GRADO**

### **GRADO EN FARMACIA**

Terapias con antisueros o IgG purificada  
obtenidas a partir de pacientes  
convalecientes de la infección por el  
SARS-CoV-2

Pedro Mariano de Vicente Muñoz

Tutor: Alfredo Prieto Martín

Curso 2020-2021

## AUTORIZACIÓN E INFORME PARA LA DEFENSA PÚBLICA DEL TRABAJO DE FIN DE GRADO

D/D<sup>a</sup> Alfredo Prieto Martín  
Profesor del Departamento de Medicina y Especialidades Médicas  
como tutor del Trabajo de Fin de Grado en Farmacia de  
D/D<sup>a</sup> Pedro Mariano de Vicente Muñoz

Titulado: Terapias con antisueros o IgG purificada obtenidas a partir de  
pacientes convalecientes de la infección por el SARS-CoV-2.

INFORMA: Que ha sido realizado y redactado por el/la alumno/a **Pedro Mariano de Vicente Muñoz** bajo mi dirección, alcanzando los objetivos de aprendizaje y las competencias transversales previstas en la guía docente de la asignatura (artículo 10 de la presente Normativa).

Con esta fecha considero APTO el mencionado trabajo, y autorizo a su presentación y defensa pública

Alcalá de Henares 5. de ...julio... de 2021.

Fdo.: Alfredo Prieto Martín



## **INDICE:**

Listado de abreviaturas .....	-2-
Resumen .....	-3-
Palabras clave .....	-3-
1. INTRODUCCIÓN .....	-4-
2. OBJETIVOS .....	-5-
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	-5-
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN: .....	-6-
4.1. Patogénesis de la infección por SARS-Cov-2 y dianas terapéuticas.....	-6-
4.2. Terapias con plasma de pacientes convalecientes y antisueros .....	-9-
4.2.a Uso clínico y antecedentes históricos .....	-9-
4.2.b Riesgos y consideraciones .....	-10-
4.3. Estrategias para la obtención de CP donante .....	-11-
4.3.a Localización y reclutamiento de donantes.....	-11-
4.3.b Determinación del título de anticuerpos neutralizantes en la muestra.....	-12-
4.3.c Inactivación viral de la muestra. Técnicas de reducción de patógenos (PRTs).....	-13-
4.3.d Productos finales .....	-15-
4.4. Terapia con CP en COVID-19.....	-16-
4.4.a Evidencia científica de eficacia del uso de plasma en el tratamiento de COVID-19.....	-16-
4.4.b Terapia con CP frente a tratamientos farmacológicos alternativos...	-22-
5. CONCLUSIONES.....	-25-
6. BIBLIOGRAFIA.....	-26-

## LISTADO DE ABREVIATURAS:

Abreviatura	Significado
CP	Plasma convaleciente / <i>Convalescent plasma</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
WHO	<i>World Health Organization</i>
SARS-CoV-1	<i>Severe acute respiratory syndrome coronavirus 1</i> / Coronavirus del síndrome respiratorio agudo 1
SARS-CoV-2	<i>Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2</i> / Coronavirus del síndrome respiratorio agudo 2
MERS	<i>Middle East respiratory syndrome</i> / Síndrome respiratorio de Oriente Medio
INFs	Interferon/es
FDA	<i>U.S Food and Drug Administration</i>
EUA	<i>Emergency Use Authoritation</i>
IND	<i>Investigational New Drug</i>
TRALI	<i>Transfusion related acute injury</i> / Lesión pulmonar aguda producida por transfusión
ADE	<i>Antibody-dependent enhancement</i> / Potenciación infecciosa dependiente de anticuerpos
NAT	<i>Nucleic acid test</i> / Test de ácidos nucleicos
PRTs	<i>Pathogen reduction techniques</i> / Técnicas de reducción de patógenos
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> / Ensayo por inmunoadsorción con anticuerpos unidos a enzimas
RR	<i>Rate ratio</i>
OR	<i>Odds ratio</i>
RCTs	Randomized controlled trials / Ensayos aleatorizados con grupo control
AEs	Adverse effects / Efectos adversos

**RESUMEN:** Los primeros casos de COVID-19 se notificaron a la OMS en diciembre de 2019. La expansión internacional de la enfermedad fue inevitable y 3 meses después la Organización Mundial de la Salud ya había declarado la pandemia. Desde entonces se han destinado numerosos recursos al desarrollo de tratamientos eficaces frente a la COVID-19 con el fin de disminuir, en la medida de lo posible; el deterioro en la salud de los pacientes infectados mientras se alcanza la inmunidad en la población gracias a la vacunación. El objeto de estudio de este trabajo es uno de estos tratamientos; el uso de plasma de pacientes recuperados (CP) o antisueros en nuevos infectados. Los antecedentes históricos presentan un escenario esperanzador en el uso de esta terapia, no obstante; en este trabajo se hace una revisión del fundamento de esta y una interpretación de los resultados estadísticos al respecto más relevantes hasta la fecha.

**PALABRAS CLAVE:** COVID-19, plasma convaleciente, antisuero, anticuerpos neutralizantes específicos, terapia, tratamiento.

**ABSTRACT:** The first cases of COVID-19 were reported to WHO in December 2019. The international spread of the disease was inevitable and 3 months later the World Health Organization had already declared a pandemic. Since then, numerous resources have been devoted to the development of effective treatments against COVID-19 in order to reduce the deterioration in the health of infected patients while immunity is achieved in the population thanks to vaccination programs. The study topic of this work is one of these treatments; the use of convalescent plasma (CP) in recently infected patients. The historical background presents a hopeful scenario in the use of this therapy, however, this work reviews the rationale for this therapy and interprets the most relevant statistical results to date.

**KEY WORDS:** *COVID-19, convalescent plasma, antiserum, neutralizing specific antibodies, therapy, treatment.*

## 1. INTRODUCCIÓN:

La infección por virus estimula la síntesis de anticuerpos específicos capaces de neutralizar química y biológicamente al virus inductor. La presencia de estos anticuerpos es determinante en el proceso de eliminación viral ya que se trata de la línea defensiva del sistema inmune más específica. Por tanto, al cursar una enfermedad producida por una infección de un virus capaz de superar con facilidad las primeras acciones del sistema inmune inespecífico (barreras físicas como la piel; proceso de inflamación, etc.), estos anticuerpos serán esenciales para superar la patología. Es muy probable que en el plasma (fracción líquida acelular de la sangre) de una persona que haya superado una enfermedad infecciosa viral permanezca una gran cantidad de los anticuerpos específicos involucrados en la defensa inmune frente al virus. Este hecho abre una oportunidad de tratamiento en otros pacientes infectados recientemente por el mismo patógeno viral; el uso de plasma convaleciente o CP (*convalescent plasma*).

En diciembre de 2019 se notificaron a la OMS (Organización Mundial de la Salud) varios casos de una neumonía viral desconocida en la ciudad de Wuhan, China. Pocos días después, el 10 de enero de 2020 se presentó el primer borrador del genoma de virus ligado a esta enfermedad. Fue denominado coronavirus de síndrome respiratorio agudo severo 2 (SARS-CoV-2). A finales del mismo mes se identificó la primera evidencia de transmisión del SARS-CoV-2 entre humanos y la capacidad de transmisión en personas asintomáticas y presintomáticas. El 11 de febrero la OMS le da el nombre de COVID-19 a la enfermedad producida por la infección del virus y un mes después, el 11 de marzo, se declara la situación de pandemia. El número creciente de afectados y fallecidos planteó la necesidad urgente de un tratamiento eficaz frente a la COVID-19 al mismo tiempo que la comunidad científica comenzó a dar los primeros pasos en el desarrollo de la vacuna frente al SARS-CoV-2 como medida de prevención para la inmunización de la población no infectada. En este contexto, el uso de plasma de pacientes recuperados de la COVID-19 se posiciona como un tratamiento potencial en base a su pronta disposición (el 27 de marzo de 2020 se inician las primeras transfusiones de plasma) y los antecedentes históricos frente a otros virus como el del Ébola o el MERS.

## **2. OBJETIVOS:**

Los objetivos de este trabajo son:

- 1) Reunir información sobre la terapia con plasma, los fundamentos teóricos sobre los que se sostiene, los procesos de obtención de dosis terapéuticas y procedimientos de acondicionamiento para la obtención del producto farmacológico.
- 2) Conocer los puntos a favor que justifican el estudio de esta terapia como potencial tratamiento para la COVID-19. Asimismo, conocer las consideraciones clínicas al respecto y los desafíos logísticos que puedan dificultar su estandarización terapéutica a gran escala.
- 3) Explorar e interpretar las evidencias científicas del uso de plasma en patologías anteriores y valorar los datos de eficacia y seguridad disponibles con relación a la aplicación de esta terapia en pacientes de COVID-19. Valorar las alternativas terapéuticas en base a la evidencia estadística.

## **3. MATERIALES Y MÉTODOS:**

Para la elaboración de este trabajo se ha realizado una búsqueda y selección de artículos científicos e información específica. Se han utilizado buscadores como PubMed o Medes empleando, entre otros; términos como: *serum, convalescent plasma, therapy, COVID-19, SARS-CoV-2, meta-analysis, MERS, SARS, COVID-19 pathogenesis, treatment*. Para la búsqueda de información técnica específica (i.e.; legislación al respecto, métodos de laboratorio registrados) se ha recurrido a páginas web oficiales de las organizaciones, entidades o empresas correspondientes. En la selección de artículos científicos se han priorizado aquellos que abordan la fisiopatología de la COVID-19, los fundamentos de la terapia con plasma y ensayos de eficacia y seguridad al respecto. El desarrollo del trabajo ha coincidido con el avance de la propia pandemia de la COVID-19 de forma que se ha realizado una revisión y actualización sistemática de la información estadística más relevante hasta la fecha.

## **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN:**

### **4.1. Patogénesis de la infección por SARS-CoV-2 y dianas terapéuticas.**

Con el fin de desarrollar terapias efectivas frente a la COVID-19, es preciso un conocimiento minucioso de la patogénesis. La información disponible permite diferenciar tres etapas clínicas que pretenden clarificar este proceso patogénico; una fase pulmonar (i), una fase proinflamatoria (ii) y una fase protrombótica (iii) . Las tres se explican brevemente a continuación:

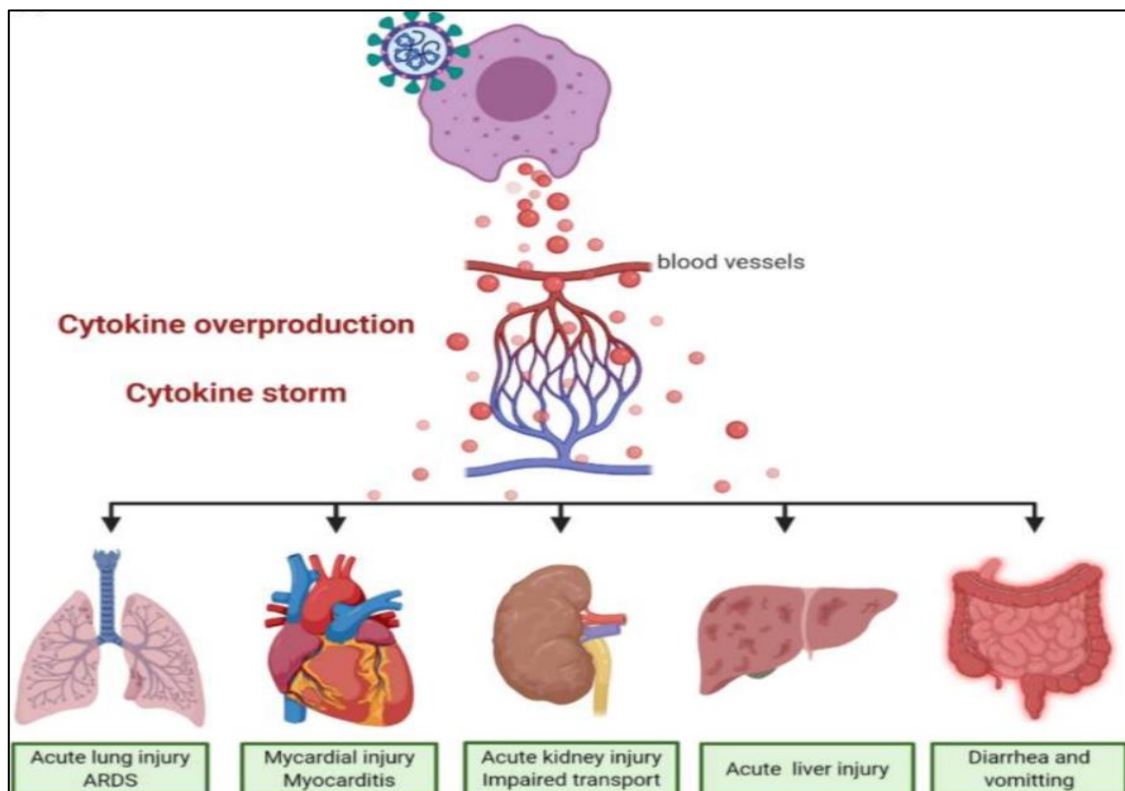
**(i)** La fase pulmonar inicia con la entrada del virus en el organismo a través de las vías respiratorias. Una vez en el alveolo, los receptores ACE2 presentes en los neumocitos de tipo 2 (los principales constituyentes celulares del epitelio alveolar junto a los neumocitos de tipo 1), se unen a la proteína S de la membrana viral provocando la unión entre la célula hospedadora y la unidad viral de SARS-CoV-2. Esta interacción origina varios eventos. Inicialmente, el complejo “virus-receptor” es introducido en la célula para la posterior replicación y liberación de nuevas unidades virales o viriones. Debido a esto se desarrolla una deficiencia de ACE2 que desencadena una sucesión de anomalías fisiológicas (eg., interrupción de la conversión de angiotensina II a angiotensina 1-7).

**(ii)** Una vez en el interior de la célula hospedadora, diferentes receptores internos de reconocimiento de patrones (Pattern recognition receptors, PRRs) reconocen los patrones moleculares asociados al SARS-Cov-2 (Pattern-associated molecular patterns, PAMPs). Esta unión, desencadena una cascada de señalización que activa varios factores involucrados en la transcripción de genes relacionados con el sistema inmune (esto es, RIG-I, TLRs y MDA5). La transcripción de estos genes diana conduce a la liberación de citocinas, INFs y quimiocinas proinflamatorias. De nuevo, de forma similar a la primera fase, esta sucesión de eventos se termina manifestando en un desequilibrio que agrava el proceso inflamatorio. Se desarrolla un edema alveolar (la elevada concentración de citocinas aumenta la permeabilidad del epitelio) afectando al intercambio gaseoso generando procesos de disnea e hipoxia. Como indica la imagen (Figura 1), la producción masiva de citocinas o “tormenta de citocinas” (Cytokine storm) es un evento realmente grave que termina produciendo efectos



extrapulmonares a diferentes niveles y en órganos clave (eg., corazón, hígado, riñón o intestinos).

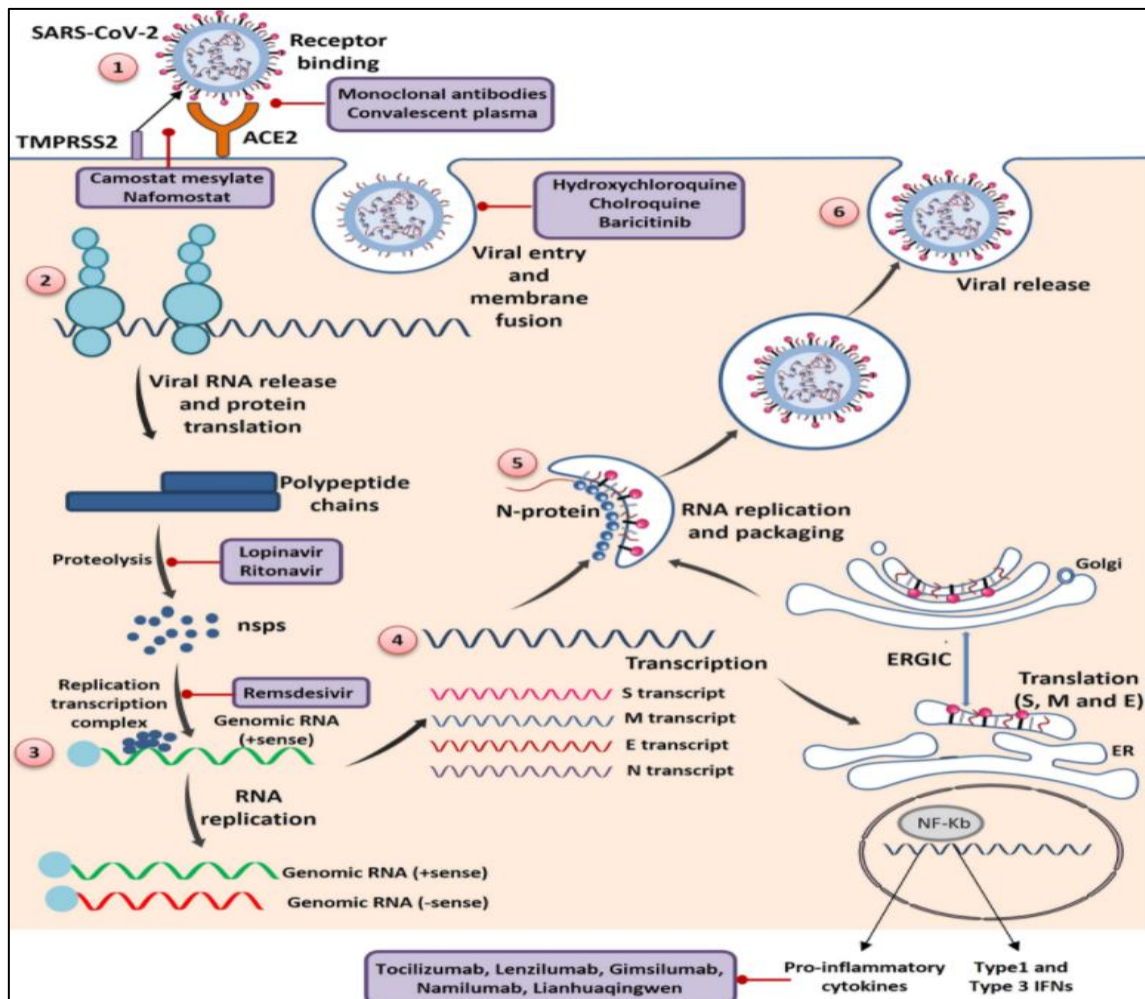
(iii) Finalmente, en una tercera fase, el proceso trombótico se ve muy favorecido como consecuencia de los mecanismos patológicos desarrollados en las etapas anteriores. Dos de los eventos que pueden explicar el aumento en el riesgo de manifestar trastornos en la coagulación son: En primer lugar, la deficiencia crónica de ACE2 previamente comentada. Este desequilibrio termina desarrollando una continua activación de la angiotensina II y en consecuencia un contexto favorable para la trombosis. En segundo lugar, el proceso de fibrinolisis mediado por plasmina (proceso regulatorio de la trombosis) esta inhibido consecuencia de la elevada presencia de PAI-1 (inducida por la infección de SARS-CoV-2) que inhibe a los activadores de la plasmina (1,2).



**Figura 1.** La tormenta de citoquinas se extiende por el resto del organismo agravando el alcance de la respuesta inflamatoria (1). Imagen tomada del trabajo de Lee C. et al., año 2021.

La respuesta inmune hiperinflamatoria es uno de los factores diferenciales para la alta mortalidad en personas de edad avanzada y una de las razones para agravar el desarrollo de la COVID-19 (2). Siguiendo esta lógica, inhibir esta

respuesta desproporcionada puede ser de gran eficacia a la hora de obtener terapias frente a la infección por SARS-CoV-2. Como se indica en la Figura 2, las opciones terapéuticas potenciales son diversas y cada una de ellas actúa en un punto concreto de ciclo viral. Las terapias basadas en el uso de anticuerpos monoclonales y plasma convaleciente actúan justo en el inicio del ciclo, inhibiendo la unión entre la proteína de unión viral (La proteína *spike* presente en la membrana del SARS-Cov-2) y su receptor (ACE2). El análisis y estudio de estas terapias es el objetivo de este trabajo (2).



**Figura 2.** Las diferentes etapas del ciclo viral (numeradas en la imagen) plantean dianas terapéuticas potenciales. Los anticuerpos monoclonales y el plasma convaleciente actúan en la primera de las fases, inhibiendo la formación del complejo antígeno-receptor (2). Imagen tomada del trabajo de Bhardwaj A. et al., año 2021.

## **4.2. Terapia con plasma de pacientes convalecientes y antisueros.**

### **4.2.a Uso clínico y antecedentes históricos.**

La terapia con plasma convaleciente (CP) o antisueros es una de las opciones para el tratamiento de la COVID-19. Históricamente las terapias basadas en la inmunidad pasiva han incluido diferentes componentes sanguíneos desde el uso de la sangre completa hasta el uso del plasma obtenido mediante aféresis; siendo este último el de preferencia. Se trata de una técnica que ha estado presente durante décadas y con una base teórica sencilla.

Se espera que la sangre de un paciente recuperado de una infección viral contenga una elevada titulación de anticuerpos frente al antígeno viral en cuestión. De esta sangre se obtiene el plasma, que se inyecta (previa preparación) en un nuevo paciente recién infectado con el fin de que los anticuerpos presentes en el plasma del donante reconozcan el antígeno viral, lo neutralicen y activen la respuesta inmunitaria contra el virus, combatiendo de esta manera la infección.

El uso de la sangre completa o el plasma del donante aporta, de forma adicional a los anticuerpos específicos; un control sobre posibles eventos hemorrágicos al mantener el fibrinógeno y otros factores involucrados en la coagulación. Esto es interesante a la hora de tratar infecciones como la del virus del Ébola (durante las primeras 24 horas, una transfusión de plasma donante puede asegurar la viabilidad de las plaquetas y factores de coagulación). No obstante, la separación y uso del suero es preferible en contextos donde lo realmente diferencial sea la presencia de anticuerpos (3,4).

Las conclusiones elaboradas con relación al uso del plasma convaleciente (CP) en los casos concretos del virus del MERS y el SARS-CoV-1 pueden suponer un buen antecedente para conocer, de forma inicial, las posibilidades de este tratamiento potencial de la COVID-19. En el caso del MERS, el uso de CP con título  $>1:80$  mostró resultados satisfactorios (5). Un estudio realizado con 80 pacientes infectados con SARS, registró una mejoría en aquellos individuos tratados antes del día 14 que se vio reflejada en su salida del hospital antes del día 22. Dejó además indicios de que una pronta administración del CP supone una mayor probabilidad de éxito en el tratamiento (6). En otra ocasión, el uso de CP con un título  $>1:640$  de anticuerpos frente al SARS-CoV-1, reportó la

recuperación y supervivencia de pacientes con un desarrollo severo de la enfermedad (4).

A pesar del optimismo que pueden suscitar los precedentes mencionados, la realidad es que se trata de un recurso utilizado en contextos de urgencia tales como pandemias o epidemias con poco margen de acción (ej., brote del Ébola en el Este africano, MERS o SARS-CoV-1). De igual forma, los estudios elaborados al respecto no son capaces de aportar conclusiones definitivas o significativas sobre la eficacia del tratamiento. A esto se une también la aparente dependencia directa del patógeno y diversos factores operacionales y logísticos (ej., tiempo, volumen de muestra y dosis de administración) en la eficacia final (4). Tanto es así, que la FDA (Food and Drug administration) permite de forma temporal el uso de CP bajo una serie de condiciones relativas a la EUA (*Emergency Use Authoritation*) dejando a un lado los restrictivos requisitos para el uso de IND (*Investigational New Drug*), categoría donde la organización incluye esta terapia (7).

#### **4.2.b Riesgos y consideraciones**

Casadevall y Pirofski advierten de los riesgos del uso del CP como terapia y los diferencian en tres categorías; (i) infección por transfusión, (ii) TRALI (*transfusion related acute injury* / lesión pulmonar aguda producida por transfusión) y (iii) ADE (*Antibody-dependent enhancement* / Potenciación infecciosa dependiente de anticuerpos) :

**(i)** Aunque se debe tener en cuenta, el uso de técnicas de prevención modernas como NAT o PRTs junto al correcto emparejamiento donante-paciente con grupos sanguíneos complementarios, hace que este riesgo sea poco probable en comparación a los restantes.

**(ii)** De forma más específica se debe considerar el desarrollo de TRALI. Esta, aunque extraña, es también muy seria y supone una severa complicación. Una posible explicación es la presencia de anticuerpos frente al antígeno leucocitario humano (HLA) o al antígeno neutrófilo humano (HNA) en el plasma del donante, de forma que puede ser necesario un ensayo conveniente adicional previo.

**(iii)** Frente a la situación ideal en la que el sistema inmune, mediante la acción de anticuerpos neutralizantes, bloquea la unión entre la unidad viral (proteína S) y la celular hospedadora (ACE2) ; se plantea la posibilidad teórica de una acción

contraproducente. La presencia de anticuerpos no neutralizantes que se unen al virus pero no neutralizan su capacidad, puede desencadenar la unión de la región constante o invariable de estos (Fc) a receptores celulares (FcR / receptores de complemento) facilitando la internalización celular del virión que, en primera instancia; estos anticuerpos pretendían neutralizar. Este es uno de los posibles mecanismos de acción dados para la explicación de este fenómeno. El uso de CP como terapia propone la obtención de preparaciones de plasma con altos niveles de anticuerpos neutralizantes específicos frente al SARS-CoV-2, por tanto; si se acepta como válido el mecanismo de acción expuesto, no es demasiado probable el desarrollo de ADE. Adicionalmente, las evidencias disponibles en los casos concretos de uso de CP en pacientes con MERS, SARS-CoV-1 e incluso casos aislados en pacientes con COVID-19, sugieren que, en este sentido; la terapia es segura (3,6). De forma similar lo hacen los resultados obtenidos al analizar la incidencia de eventos adversos graves en 5000 pacientes hospitalizados por COVID-19 (8).

#### **4.3. Estrategias para la obtención de CP donante.**

Existen diferentes consideraciones a la hora de validar como terapia el proceso de obtención del plasma y su posterior transfusión. Una buena estrategia para la obtención de donantes, junto al testeo mediante ensayos debidamente aprobados de la capacidad neutralizante frente al SARS-Cov-2 del CP y la elaboración de programas de dosificación y conservación son puntos esenciales para asegurar la eficacia y el buen funcionamiento del protocolo terapéutico, así como la seguridad de pacientes y donantes (4).

##### **4.3.a Localización y reclutamiento de donantes.**

De forma óptima, con el fin de evitar las complicaciones que puedan derivar de la mutación de algunos antígenos virales (situación ya presente en el caso del SARS-CoV-2 ), es ideal que los donantes pertenezcan a la misma zona que los pacientes que reciben el tratamiento. La influencia constante de numerosos factores diferentes hace que esta no sea la tesitura habitual, dando paso a estrategias más realistas. Una primera opción puede ser el cribado general de la sangre de la población donante en busca de muestras que presenten anticuerpos. No es demasiado rentable, pero en zonas con alta incidencia se

puede obtener un número notable de donantes e incluso llevar a cabo estudios de seroprevalencia.

El seguimiento de pacientes que han sido dados de alta, para la obtención de potenciales donantes; presenta una relación coste-beneficio prometedora, no obstante; la necesidad de hospitalización es indicativo de pacientes de edad avanzada con presencia de comorbilidades mayoritariamente, un perfil incompatible con la donación (3).

Una alternativa a las dos anteriores, es la identificación de donantes entre los pacientes positivos que realizan la cuarentena en su domicilio. Por una parte, cabe esperar un exitoso “reclutamiento” al presentar estos un cuadro leve o medio de la enfermedad (no requieren hospitalización al permanecer en casa) (3). Por otra parte, se espera que el título de anticuerpos en donantes con este grado de desarrollo de la enfermedad no sea demasiado elevado atendiendo a estudios precedentes con relación a infecciones como el MERS (9).

La sensación de urgencia consecuencia de la pandemia de la COVID-19, no permite desechar ninguna estrategia y aunque el título de anticuerpos neutralizantes sea menor de lo deseado en el último caso comentado; es un recurso más hasta que se disponga de un suministro suficiente que permita centrarse únicamente en plasma de titulación mayor. Con el fin de evitar que la extracción del plasma cause una anemia innecesaria en el donante, este es obtenido de forma directa mediante aféresis. Gracias a esta técnica se consiguen adicionalmente mayores volúmenes de plasma que los disponibles en las donaciones de sangre completa (3).

#### **4.3.b Determinación del título de anticuerpos neutralizantes en la muestra.**

La capacidad de bloqueo o neutralización del virus está relacionada con la cantidad de anticuerpos presentes frente a diferentes epítomos del virión.

Este parámetro es evaluado mediante una prueba de neutralización por reducción de placas (PRNT), que requiere personal cualificado y líneas celulares competentes para la replicación. El tiempo empleado en la preparación y elaboración de este ensayo es notable y las instalaciones que requiere son

costosas de manera que en contextos de urgencia o de falta de los recursos, es necesaria una alternativa a la PRNT.

Los resultados de un estudio respaldan la opción del método ELISA (ensayo por inmunoadsorción con anticuerpos unidos a enzimas), en concreto el Euroimmun ELISA IgG; como alternativa de uso en la detección del título de anticuerpos neutralizantes frente al SARS-CoV-2. El 60% de las muestras con títulos > 1:100 son detectadas con un 100% de especificidad (3).

Actualmente la FDA (Food and Drug Administration) recomienda un título de anticuerpos neutralizantes en sangre >1:2880 (4)(10). Este criterio es el seguido en estudios donde solo donantes con una titulación >1:2880 de IgG con afinidad por la proteína *spike* del virión (SARS-CoV-2) determinada mediante MSH-ELISA son incluidos en el proceso de donación mediante plasmaféresis (11).

#### **4.3.c Inactivación viral de la muestra. Técnicas de reducción de patógenos (PRTs).**

El objetivo principal de estos métodos es la eliminación o reducción de la presencia de patógenos de la muestra y así evitar infecciones derivadas de la transfusión en los pacientes que reciben el tratamiento. Supone un filtro de seguridad adicional dada la situación de incertidumbre y apuro asociada al desarrollo de la pandemia actual.

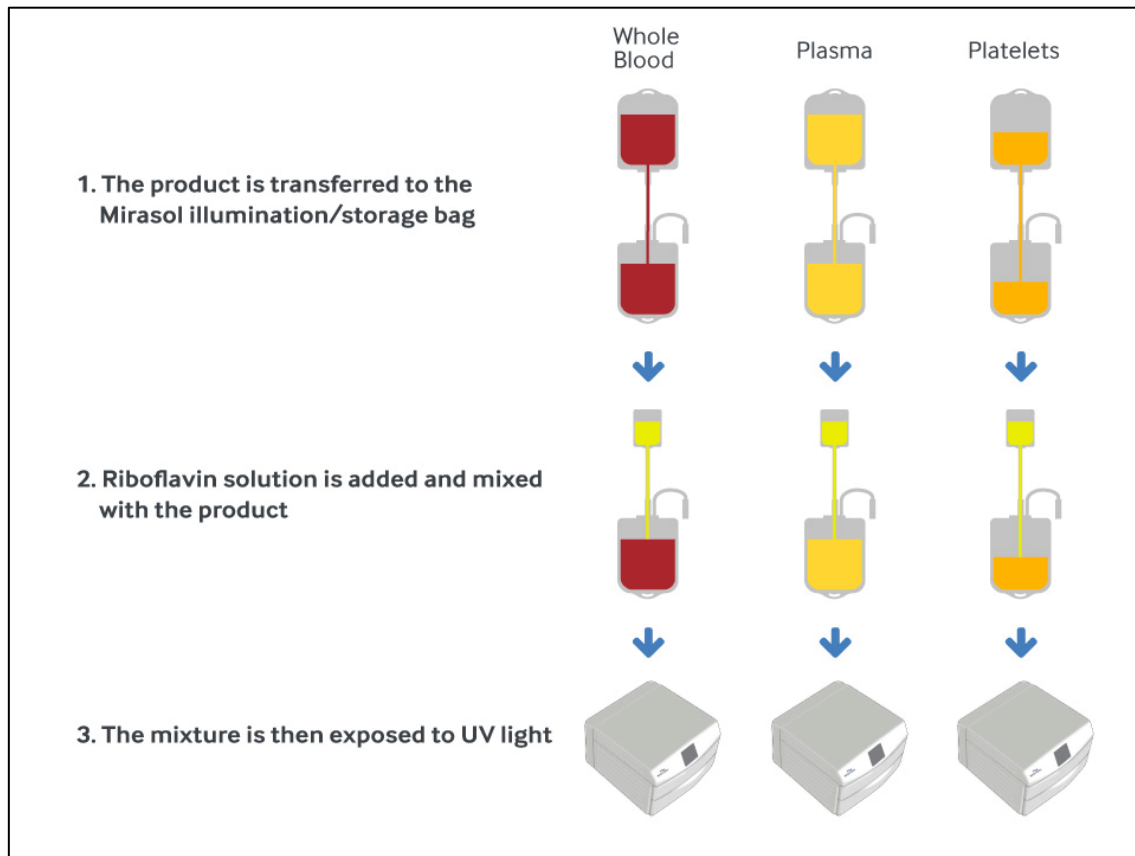
No se considera suficiente el uso de test de ácidos nucleicos virales convencionales (NAT) (i.e., NAT para el virus de la Hepatitis C, virus de la Hepatitis B y HIV) para afianzar la seguridad del tratamiento, es necesario el uso de NAT adicionales y las PRTs pertinentes.

Actualmente existen dos PRTs de gran eficacia en el tratamiento del plasma donante. Ambos basan su mecanismo de acción en la fotoinactivación.

El método INTERCEPT (Cerus) utiliza la combinación de Amotosalen bajo radiación UV A para intervenir en la replicación de DNA o RNA (3,12).

De una forma similar actúa el método Mirasol (Terumo BTC), introduciendo en la muestra riboflavina en presencia de luz UV B (3,13). Ha demostrado gran eficacia al disminuir en un 87% la infección de malaria asociada a la transfusión (14). En el caso del Ébola, la carga viral presente en el plasma (o sangre completa ) se

ve reducida a niveles inferiores a los límites de detección; manteniendo paralelamente la concentración de anticuerpos dentro de los márgenes de referencia. Es destacable la eficacia demostrada frente al MERS al tratarse de un virus perteneciente a la misma familia que el SARS-CoV-2 (4). De forma adicional, el método Mirasol es capaz de inactivar leucocitos residuales en la muestra, lo que supone una medida de prevención frente a posibles reacciones no deseadas durante la transfusión en los pacientes (13).



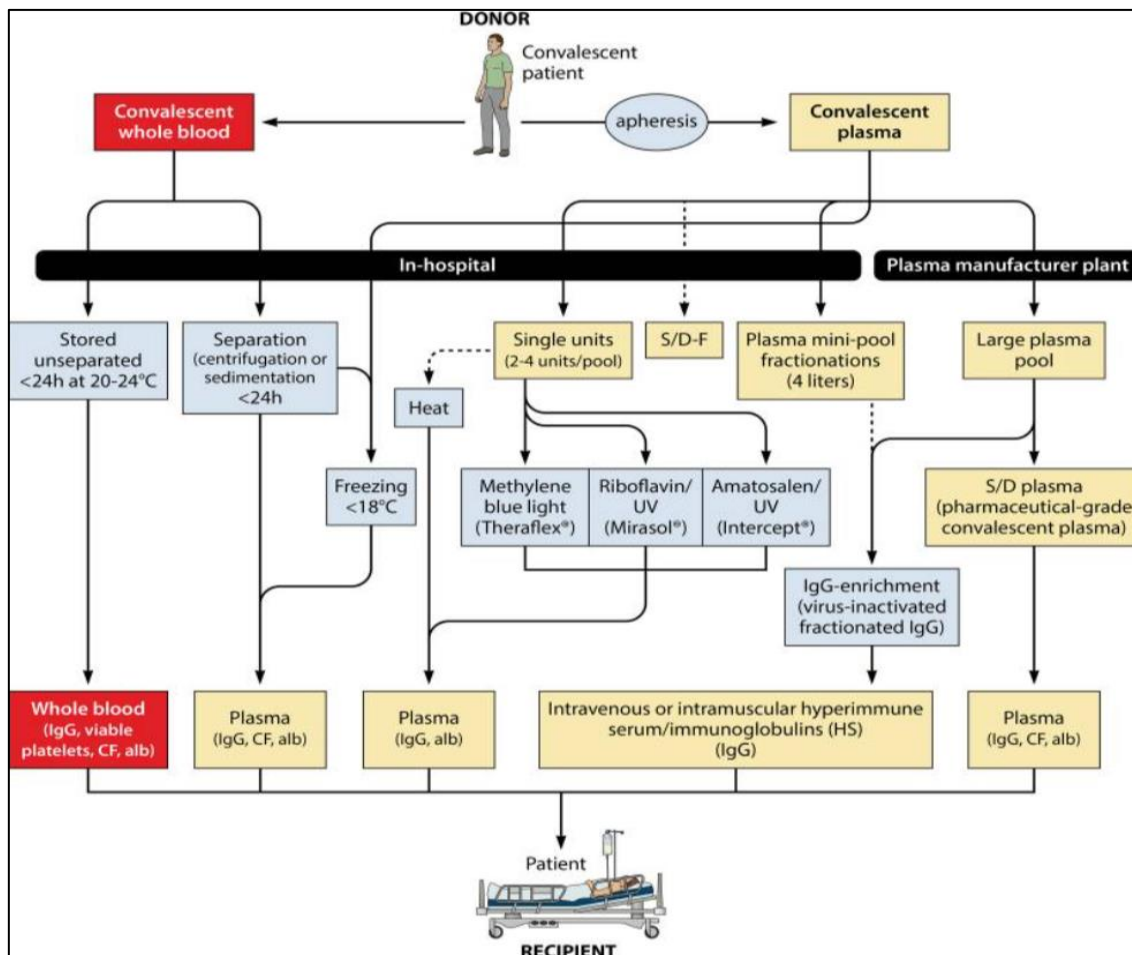
**Figura 3.** Proceso de utilización del PRT Mirasol en la inactivación de patógenos en diferentes productos sanguíneos (13). Imagen tomada de la página web oficial de *Mirasol® Pathogen Reduction Technology*, año 2021.

El tratamiento con solvente/detergente y posterior filtración es otro método a considerar, no obstante; su uso está direccionado en mayor medida a grandes reservas de plasma. Aunque ha sido utilizado como PRT para tratar pequeñas cantidades, incluso dosis únicas; no es una opción de gran valor por el momento (3).



#### 4.3.d Productos finales.

La Figura 4 esquematiza las diferentes vías y procedimientos de obtención de CP, sangre completa del donante o IVIg (Inmunoglobulina intravenosa).



**Figura 4.** Esquema de los productos potenciales derivados del plasma y sangre obtenidos de donantes y sus procedimientos. Imagen tomada del trabajo de Focosi D. et al., año 2020.

Con relación al almacenamiento y obtención de reservas o *pools* de CP, para su posterior tratamiento y dosificación; existen varios enfoques. Una primera opción, es el uso de las unidades individuales de CP obtenido del donante mediante aféresis. La unidad de CP se somete a uno de los PRTs explicados y se obtiene el producto para la transfusión. En segundo lugar, como alternativa a pequeña escala; se puede considerar la elaboración de *mini-pools* que reúnan cuatro litros de CP aproximadamente, para su posterior fraccionamiento en unidades individuales. La obtención de grandes *pools* de plasma requiere instalaciones de carácter industrial alcanzando cantidades de entre 2000 y 4000

litros. Como se ha indicado en el apartado anterior, para la inactivación de patógenos de las dosis fraccionadas procedentes de estos grandes *pools* de plasma, se utiliza mayoritariamente un tratamiento solvente/detergente (3).

Como alternativa al plasma, se puede obtener suero hiperinmune o IVIg hiperinmune mediante un enriquecimiento del plasma fraccionado. Independientemente de la variedad de procedimientos de elaboración por parte de los fabricantes; el producto final consiste en un concentrado de IgG junto a cantidades menores de IgA e IgM con una vida media de 21 días (15).

Al ser considerada como una terapia en investigación, no existe una demanda suficiente para la creación de programas de obtención de CP frente a SARS-CoV-2 a nivel industrial. Actualmente las unidades de plasma utilizadas son suministradas por los servicios públicos locales u obtenidas y preparadas en el mismo centro donde se lleva a cabo la dosificación.

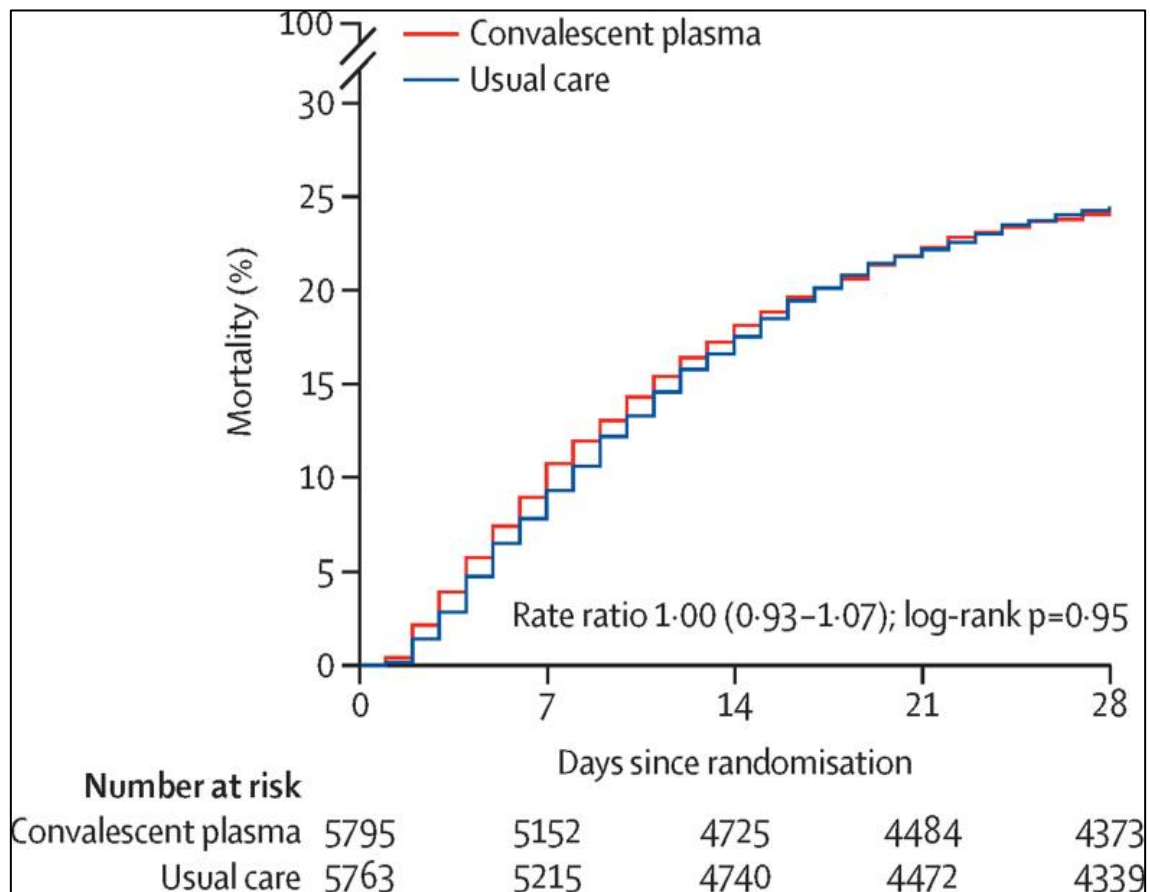
#### **4.4. Terapia con Cp en COVID-19.**

##### **4.4.a Evidencia científica de eficacia del uso de plasma en el tratamiento de COVID-19.**

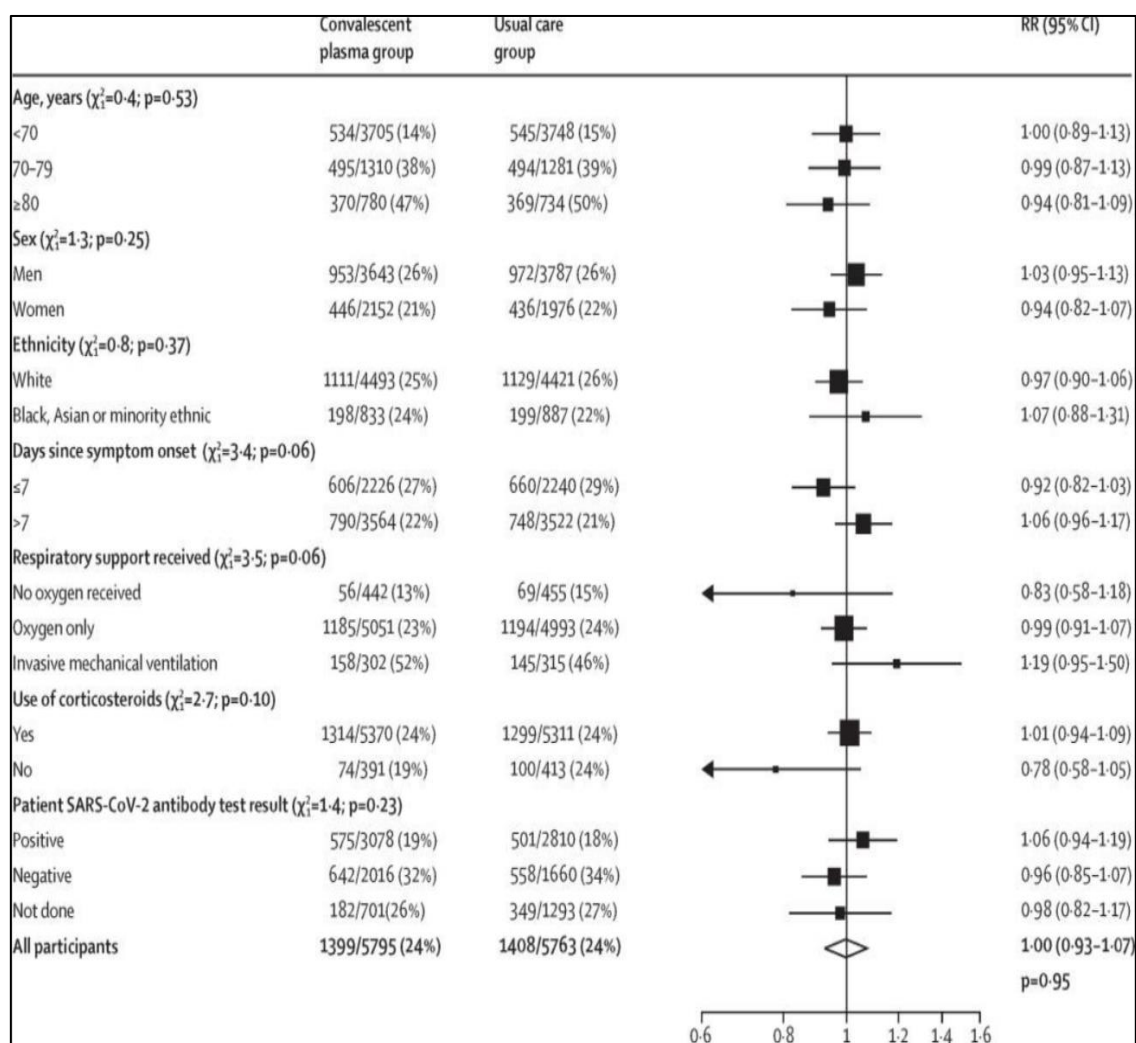
Durante la pandemia de la COVID-19 se han ido desarrollando numerosos ensayos clínicos con el fin de evaluar la eficacia y seguridad del uso de CP. A pesar de la heterogeneidad de estos y la falta de recursos para generar una consistencia suficiente en los resultados, hay suficiente información para valorar los beneficios y conflictos más importantes hasta la fecha.

RECOVERY es uno de los ensayos más consistentes al respecto. Es un ensayo aleatorio con grupo control y sin enmascaramiento o abierto (RCT ; *randomized clinical trial*). Se realizó en 177 hospitales del NHS (*National Health Service / Servicio Nacional de Salud*) en Reino Unido. Tras un proceso de aleatorización (1:1) del total de los pacientes reclutados (n=11558), a 5795 pacientes se les asignó al grupo tratado con CP (grupo CP) y a los 5763 restantes al grupo control (16). La mortalidad a los 28 días desde la aleatorización fue el parámetro seleccionado con el fin de evaluar la eficacia de la terapia con CP. La Figura 5 presenta el porcentaje de mortalidad en ambos grupos (grupo control y grupo CP) a lo largo de este periodo. Según la gráfica, el porcentaje de mortalidad en ambos grupos a los 28 días es similar, 24% (*rate ratio* RR 1.0; 95% IC 0.93-1.07;

p=0.95). Asimismo, en base a la Figura 6, los resultados obtenidos al analizar el uso de CP en los subgrupos de pacientes elaborados según características establecidas antes de la aleatorización (edad; sexo; etnia; días desde aparición de síntomas; asistencia respiratoria; uso de corticoesteroides; test de presencia de anticuerpos frente SARS-CoV-2), no mostraron una diferencia significativa entre grupo control y grupo CP (RR 1.0 95%IC 0.93-1.07; p=0.95).

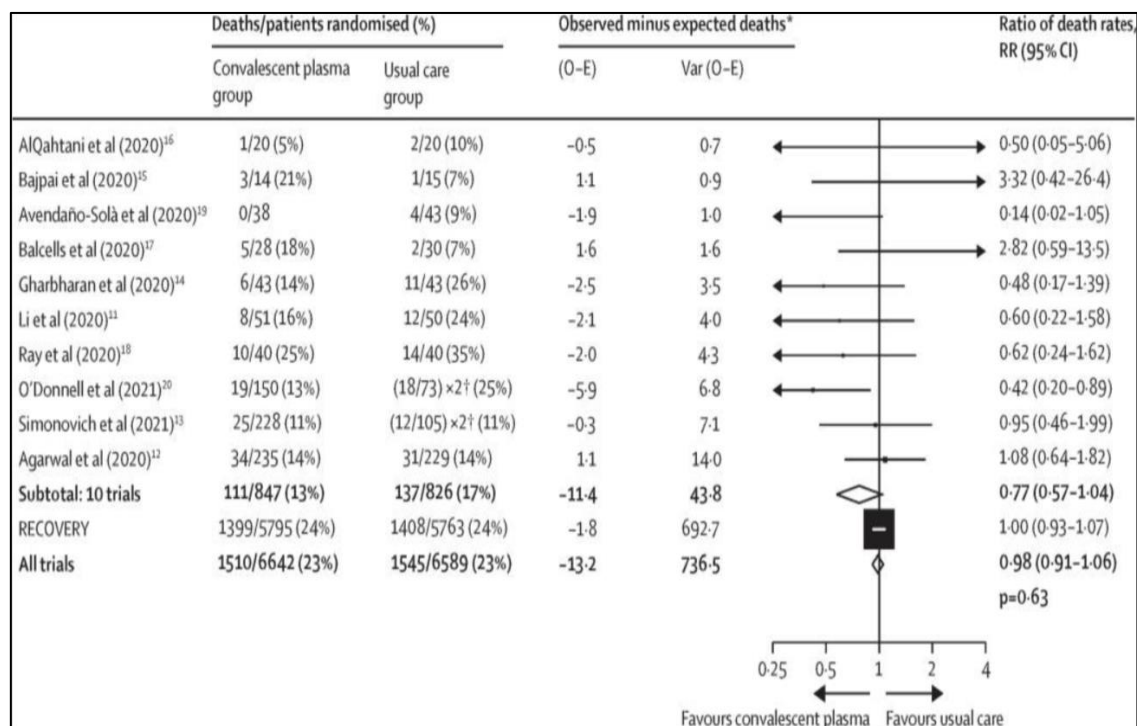


**Figura 5.** Representación del porcentaje de pacientes fallecidos en el grupo CP y grupo control frente a los días desde la aleatorización. El número total de pacientes durante el ensayo se muestra en la tabla de la parte inferior de la imagen. Gráfica tomada del trabajo de Abani et al., año 2021.



**Figura 6.** *Forest plots* donde se representa el efecto del CP en los subgrupos diferenciados según las características específicas establecidas. Valores menores a 1.0 favorecen al grupo CP y valores superiores a 1.0 favorecen al grupo control. Figura tomada del trabajo de Abani et al., año 2021.

Estos resultados siguen la línea de otros estudios desarrollados con el mismo objetivo. Al realizar un metaanálisis (Figura 7) con otros 10 estudios aleatorios que incluían un total de 1495 pacientes, no se obtuvo una asociación entre el uso de CP y una reducción en la mortalidad (RR 0.77 95%IC 0.57-1.04;  $p=0.08$ ). Al incluir los datos de RECOVERY en el análisis, el valor obtenido para el RR fue 0.98 (95% IC 0.91-1.06;  $p=0.63$ ; Figura 7), confirmando la interpretación de los valores anteriores (16).



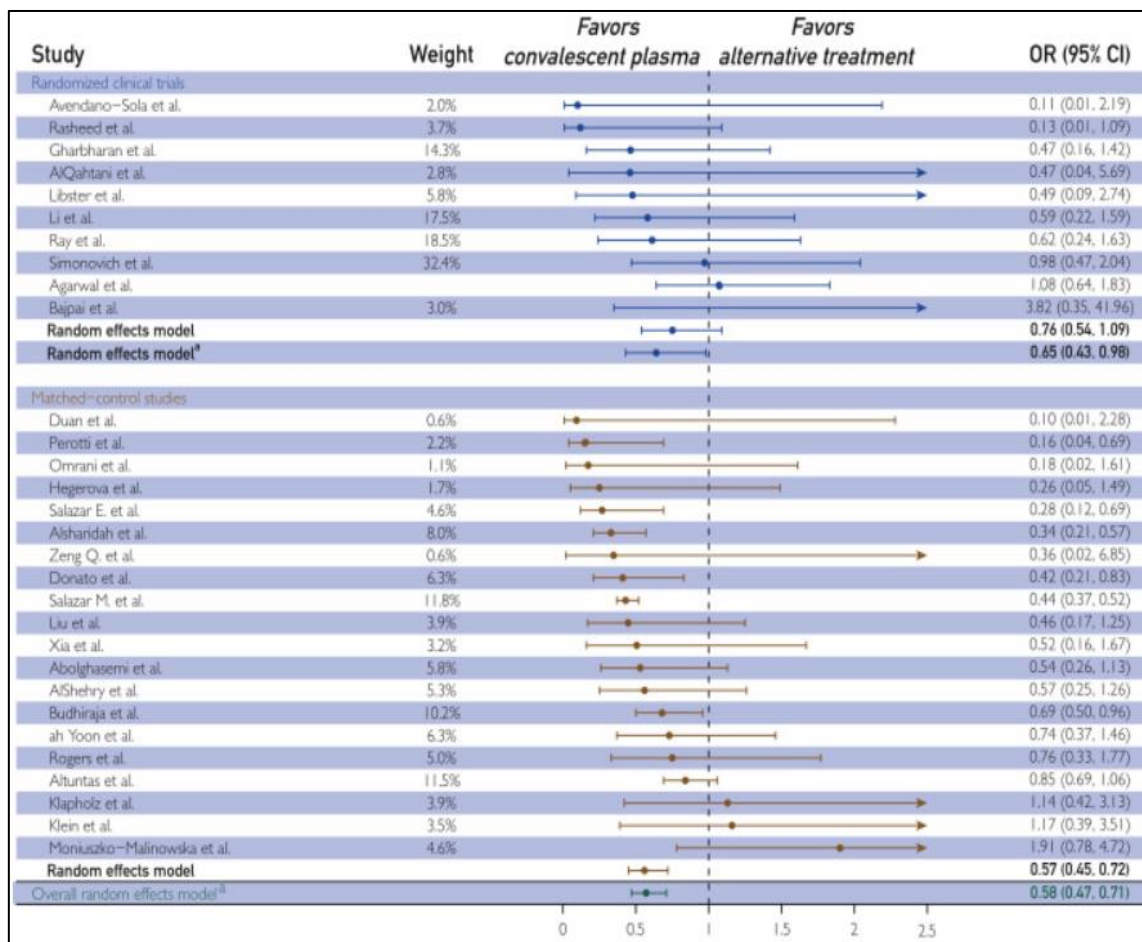
**Figura 7.** *Forest plots* del metaanálisis realizado incluyendo otros diez ensayos realizados durante 2020 y 2021. Figura tomada del trabajo de Abani et al., año 2021.

La información que facilita este estudio con relación a la efectividad del uso de CP en pacientes de COVID-19 es bastante robusta teniendo en cuenta que se trata del ensayo aleatorio de mayor volumen hasta la fecha. Existen algunos factores de gran influencia en la eficacia de esta terapia y se deben considerar a la hora de desarrollar el ensayo e interpretar los resultados de este. La titulación de anticuerpos neutralizantes frente al SARS-CoV-2 en la dosis de CP se ha sugerido como uno de los elementos determinantes para la obtención de resultados beneficiosos (17). Con relación a esta consideración, en RECOVERY, todas las unidades de CP utilizadas durante el ensayo fueron suministradas por los *UK National Blood Services* siguiendo los protocolos pertinentes. Se utilizó EUROIMMUN ELISA para el cribado de plasma donante válido para su uso en el ensayo ( un valor de 6.0 en la prueba fue el criterio de selección, mientras que la FDA considera una titulación elevada valores por encima de 3.5) y se administró a los pacientes del grupo CP dosis de diferentes donantes, para asegurar que al menos una de las unidades tuviese un título de anticuerpos neutralizantes elevado (16).

El subgrupo de pacientes que recibió la primera dosis de CP en los primeros siete días desde la aparición de los síntomas no presentó una diferencia significativa en la mortalidad al compararlo con los pacientes que recibieron la primera dosis pasada la primera semana (RR 0.92 IC 95% 0.82-1.03; Figura 6). No obstante, RECOVERY solo incluye pacientes hospitalizados, de forma que no puede desechar la posibilidad de que la transfusión de CP dentro de un periodo cercano a la infección por SARS-CoV-2 y anterior a la aparición de los primeros síntomas pueda ser beneficiosa. Esta opción todavía no ha sido estudiada de forma consistente. Existen ensayos al respecto que sugieren una reducción en la progresión de la enfermedad a un síndrome respiratorio grave en un 48% cuando la transfusión se realiza en las primeras 72 horas desde la aparición de los primeros síntomas (18).

En un segundo metaanálisis se seleccionaron 30 ensayos. De estos 10 eran RCTs y 20 eran MCS (Matched control study). Como muestra la Figura 8, al analizar los 10 RCTs no se encontró una asociación significativa entre una reducción en la mortalidad y los pacientes que recibieron el tratamiento con CP (*odds ratio* OR 0.76 IC 95% 0.54-1.09). No obstante, en el estudio de Agarwal et al.; los pacientes recibieron dosis de plasma con una titulación baja de anticuerpos neutralizantes e incluso indetectable (<1:80). Como se ha mencionado anteriormente, la titulación del CP ha demostrado ser un factor determinante. Al excluir el ensayo de Agarwal et al. del análisis, el valor de OR fue 0.65 (0.43-0.98 IC 95%, Figura 8). Tras este ajuste, la diferencia en la mortalidad entre ambos grupos de pacientes es significativa y respalda los ensayos que destacan la importancia de un título elevado de anticuerpos neutralizantes en la dosis de CP.

Al analizar los datos de los 20 MSC se observó una mortalidad menor en el grupo de pacientes tratados con CP frente a los pacientes no tratados, siendo un 21% frente a un 29% respectivamente (OR 0.57 IC 95% 0.45-0.72, Figura 8).



**Figura 8.** Efecto de CP en la mortalidad de pacientes con COVID-19. El *Forest plots* ilustra el OR (IC 95%) de cada estudio y el OR total para cada grupo de ensayos ( RCTs y MCS). Los datos de RCTs se presentan en azul mientras que los de MCS se presentan en naranja. El peso o influencia de cada estudio se indica en la columna de porcentajes. Valores menores a 1.00 favorecen a la terapia con CP, valores superiores a 1.00 favorecen a terapias alternativas. La última línea presenta la síntesis de la información total con exclusión del estudio de Agarwal et al. (overall). *Forest plots* tomado de Klassen et al., año 2021.

Los pacientes que recibieron la transfusión de CP presentaron una menor mortalidad cuando se realizó el análisis de ambos tipos de estudios conjuntamente, en concreto una reducción del 42 % (OR 0.58 IC 95%; 0.47-0.71; Figura 8). El desarrollo de metaanálisis que combinen RCTs y MCS con un mismo objeto de análisis se recomienda con el fin de aclarar cuestiones que este tipo de estudios no puedan resolver de forma individual (19). No obstante, es interesante comparar únicamente los resultados obtenidos en el metaanálisis de los RCTs con la información que aporta RECOVERY puesto que siguen la misma



línea de interpretación: no existe una asociación significativa entre el uso de CP y una reducción en los registros de mortalidad de pacientes por COVID-19. Es preciso destacar que la heterogeneidad ( $I^2$ ) del metaanálisis específico de los RCTs es baja ( $I^2 = 7\%$ ) e indica robustez en los resultados de la síntesis (20).

#### **4.4.b Terapia con CP frente a tratamientos farmacológicos alternativos.**

De forma paralela a la exploración del uso de plasma en el tratamiento de la COVID-19, existen otras líneas de trabajo e investigación que buscan definir una terapia efectiva entre las presentes estrategias farmacológicas. Por esta razón, una comparación precisa de las potenciales posibilidades terapéuticas puede aportar información de gran valor y guiar a la comunidad científica hacia la solución de este dilema.

F.De Crescenzo et al. realizaron una comparación mixta de tratamientos en forma de metaanálisis en red (*Network Meta-analysis*) donde incluyeron 42 estudios. Cada una de las terapias fue analizada con respecto al parámetro de la mortalidad. De igual forma, en términos de seguridad (efectos adversos; AEs) se analizaron 30 estudios. Tras la síntesis de toda la información se realizó una comparativa de las terapias en base a los RR (*rate risk*) obtenidos del análisis de los parámetros mencionados (21). La Tabla 1 resume la información extraída de la comparativa inicial con relación a los tratamientos más representativos (i.e.; remdesivir, hidroxycloquina, lopinavir/ritonavir, corticoesteroides y plasma) (21). En esta comparación (Tabla 1) se incluyen los resultados relacionados a los pacientes tratados con placebo o *standard of care* / SC (servicios clínicos asistenciales básicos estandarizados en relación con la patología, un ejemplo en el caso de la COVID-19 es la respiración asistida).

Con relación a la mortalidad, solo los corticoesteroides mostraron una reducción significativa al compararlos con el placebo o *standard care* (RR 0.90 IC 95% 0.83-0.97; Tabla 1) y el tratamiento con hidroxycloquina (RR 0.83 IC 95% 0.74-0.84; Tabla 1). El tratamiento con plasma mostró resultados desfavorables significativos en la asociación con la presencia de efectos adversos (AEs) al compararlo con el tratamiento con remdesivir (1.74 IC 95% 1.06-2.87; Tabla 1) y la terapia de combinación de lopinavir/ritonavir (0.49 IC 95% 0.25-0.95; Tabla 1).

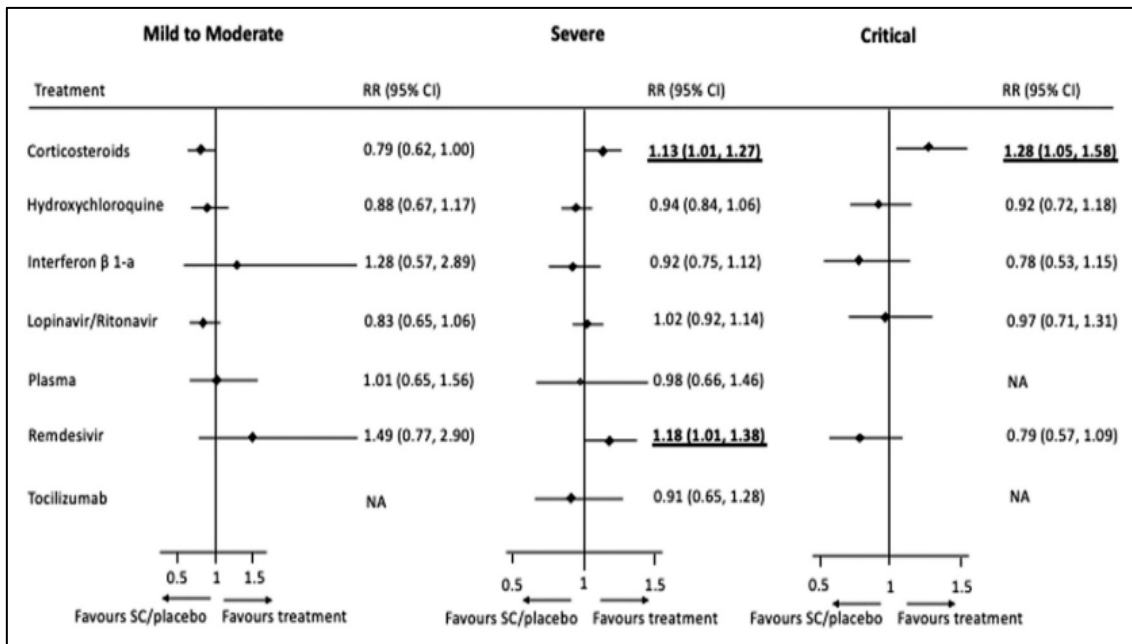


EFECTOS ADVERSOS (RR)					
<b>Standard Care/ placebo</b>	<b>0.75 (0.63-0.89)</b>	1.30 (0.82-2.08)	0.63 (0.39-1.03)	1.10 (0.67-1.79)	0.93 (0.37-2.32)
1.07 (0.94-1.22)	<b>Remdesivir</b>	<b>1.74 (1.06-2.87)</b>	0.85 (0.50-1.42)	1.47 (0.87-2.46)	1.25 (0.49-3.16)
1.07 (0.8-1.42)	1.00 (0.73-1.36)	<b>Plasma</b>	<b>0.49 (0.25-0.95)</b>	0.94 (0.46-1.90)	0.72 (0.26-1.99)
0.99 (0.90-1.08)	0.92 (0.78-1.09)	0.92 (0.69-1.24)	<b>Lopinavir/Ritonavir</b>	1.73 (0.87-2.24)	1.48 (0.52-4.15)
0.93 (0.85-1.02)	0.87 (0.74-1.02)	0.87 (0.65-1.18)	0.95 (0.83-1.08)	<b>Hidroxiclora- quina</b>	0.85 (0.30-2.39)
<b>0.90 (0.83-0.97)</b>	1.04 (0.89-1.21)	1.04 (0.78-1.40)	1.13 (1.00-1.46)	<b>0.83 (0.74-0.84)</b>	<b>Corticoesteroides</b>
MORTALIDAD (RR)					

**Tabla 1.** RRs obtenidos del Metaanálisis en red con relación a los parámetros: mortalidad (azul) y AEs (naranja). Las terapias siguen un orden alfabético y se presentan en verde. La comparación se debe hacer de izquierda a derecha. Los valores de RR de las intersecciones entre terapias siguen la siguiente interpretación: RRs (mortalidad) > 1.00 favorecen a la terapia que define la columna; RRs (AEs) > 1.00 favorecen a la terapia que define la fila. Modificado a partir de F.De Crescenzo et al., año 2021.

En una síntesis adicional (Figura 9), se analizó el efecto de varias terapias en el parámetro de mortalidad según el cuadro de COVID-19 que cursaron los pacientes de los estudios incluidos (*Leve-Medio/Mild to moderate*; *Grave/Severe*; *Crítico/Critical*). En base a los datos presentados en la Figura 9, el uso de plasma no se muestra favorable en ninguna de los casos clínicos (RR 1.01 IC 95% 0.65-1.56 / RR 0.98 IC 95% 0.66-1.46) mientras que los corticoesteroides

y el remdesivir se sugieren como opciones efectivas para pacientes que cursen un curso grave de COVID-19 (RR 1.13 IC 95% 1.01-1.27; corticoesteroides / RR 1.18 IC 95% 1.01-1.38; remdesivir).



**Figura 9.** El *Forest plots* representa los resultados en el metaanálisis de la eficacia del tratamiento según la gravedad del cuadro de COVID-19. Valores para  $RR > 1$  favorecen a la terapia y valores para  $RR < 1$  favorecen el placebo o SC. Figura tomada del trabajo de De Crescenzo et al., año 2021.

## **5. CONCLUSIONES:**

- 1)** El uso de plasma convaleciente (CP) y antisueros es un tratamiento basado en la inmunidad pasiva y su eficacia depende de factores como la dosis, el título de anticuerpos neutralizantes específicos en la muestra, las manifestaciones clínicas de la patología en el paciente o el momento de administración.
- 2)** Existen precedentes históricos del uso de esta terapia en enfermedades producidas por la infección de virus como el virus del Ébola, MERS o SARS-1, que incitan al estudio de su eficacia en nuevas patologías como la COVID-19.
- 3)** Con relación a la localización y selección de donantes. Se requiere un resultado positivo en un ensayo de detección de anticuerpos específicos frente al SARS-CoV-2 y un título de anticuerpos elevado utilizando como referencia los ensayos aceptados por las autoridades competentes. Una sintomatología grave de la COVID-19 y la hospitalización se asocia a un mayor título de anticuerpos en plasma, pero a su vez presenta una mayor incompatibilidad para la donación de productos sanguíneos.
- 4)** Hasta que no se trate de una terapia aprobada por las autoridades competentes como la FDA o EMA, la obtención de las dosis de plasma se seguirá realizando a pequeña escala ya que; los desafíos logísticos que presenta la producción industrial requieren demasiados recursos (volumen económico, personal cualificado, etc.) que actualmente están destinados al resto de servicios de salud prioritarios para poner fin a la pandemia.
- 5)** No existe suficiente evidencia científica para asegurar que el uso de CP en pacientes de COVID-19 sea eficaz y son necesarios más ensayos clínicos de calidad al respecto.
- 6)** No está descartada la posibilidad de que la administración de CP durante los primeros días después de la infección este asociada a una reducción en la gravedad de la sintomatología y en la tasa de mortalidad.
- 7)** El título de anticuerpos de las unidades de plasma utilizadas es un factor esencial para la obtención de resultados favorables significativos.
- 8)** Existen otros tratamientos en investigación frente a la COVID-19 con mejores datos en eficacia y seguridad (presencia de efectos adversos) en comparación al uso de CP, que pueden dejar al tratamiento con plasma y antisueros en un plano secundario al que recurrir en situaciones de emergencia de forma experimental, como ha sucedido con la pandemia de la COVID-19.

## 6. BIBLIOGRAFIA:

1. Lee C, Choi WJ. Overview of COVID-19 inflammatory pathogenesis from the therapeutic perspective [Internet]. Vol. 44, Archives of Pharmacal Research. Pharmaceutical Society of Korea; 2021 [cited 2021 May 18]. p. 99–116. Available from: [/pmc/articles/PMC7781412/](#)
2. Bhardwaj A, Sapra L, Saini C, Azam Z, Mishra PK, Verma B, et al. COVID-19: Immunology, Immunopathogenesis and Potential Therapies. *Int Rev Immunol* [Internet]. 2021;0(0):1–36. Available from: <https://doi.org/10.1080/08830185.2021.1883600>
3. Focosi D, Anderson AO, Tang JW, Tuccori M. Convalescent plasma therapy for covid-19: State of the art. *Clin Microbiol Rev*. 2020;33(4):1–17.
4. Brown BL, McCullough J. Treatment for emerging viruses: Convalescent plasma and COVID-19. *Transfus Apher Sci*. 2020;59(3).
5. Ko JH, Seok H, Cho SY, Ha YE, Baek JY, Kim SH, et al. Challenges of convalescent plasma infusion therapy in Middle East respiratory coronavirus infection: A single centre experience. *Antivir Ther*. 2018;23(7):617–22.
6. Casadevall A, Pirofski LA. The convalescent sera option for containing COVID-19. *J Clin Invest*. 2020;130(4):1545–8.
7. U.S. Food and Drug Administration (FDA). Recommendations for Investigational COVID-19 Convalescent Plasma. *Food Drug Adm* [Internet]. 2020 [cited 2021 May 14];1–7. Available from: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/investigational-new-drug-applications-inds-cber-regulated-products/recommendations-investigational-covid-19-convalescent-plasma#Collection>
8. Joyner MJ, Wright RS, Fairweather D, Senefeld JW, Bruno KA, Klassen SA, et al. Early safety indicators of COVID-19 convalescent plasma in 5000 patients. *J Clin Invest* [Internet]. 2020 Sep 1 [cited 2021 May 22];130(9):4791–7. Available from: [/pmc/articles/PMC7456238/](#)
9. Choe PG, Perera RAPM, Park WB, Song KH, Bang JH, Kim ES, et al. MERS-CoV antibody responses 1 year after symptom onset, South Korea, 2015. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2017 Jul 1 [cited 2021 May 14];23(7):1079–84. Available from: <https://dx.doi.org/10.3201/eid2307.170310>
10. FDA. Convalescent Plasma EUA Letter of Authorization. 2020 [cited 2021 Jun 21];1–9. Available from: <https://www.govinfo.gov/content/pkg/FR-2020-04-01/pdf/2020-06905.pdf>.
11. Liu STH, Lin HM, Baine I, Wajnberg A, Gumprecht JP, Rahman F, et al. Convalescent plasma treatment of severe COVID-19: a propensity score-matched control study. *Nat Med* [Internet]. 2020;26(11):1708–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41591-020-1088-9>
12. Cerus Corporation. Mechanism of Action - Amotosalen The INTERCEPT™ Blood System by Cerus Corporation [Internet]. 2020 [cited

- 2021 May 14]. Available from:  
<https://www.interceptbloodsystem.com/en/blood-center/intercept/mechanism-action-amotosalen>
13. Mirasol® Pathogen Reduction Technology [Internet]. [cited 2021 May 14]. Available from: <https://www.terumobct.com/mirasol>
  14. Allain J-P, Owusu-Ofori A, Assennato SM, Marschner S, Goodrich RP, Owusu-Ofori S. Prevention of Transfusion-Transmitted Malaria By Treatment of Whole Blood with the Mirasol® PRT System. *Blood*. 2015 Dec 3;126(23):770–770.
  15. Moradimajd P, Samaee H, Sedigh-Maroufi S, Kourosh-Aami M, Mohsenzadagan M. Administration of intravenous immunoglobulin in the treatment of COVID-19: A review of available evidence [Internet]. Vol. 93, *Journal of Medical Virology*. John Wiley and Sons Inc; 2021 [cited 2021 May 22]. p. 2675–82. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jmv.26727>
  16. Abani O, Abbas A, Abbas F, Abbas M, Abbasi S, Abbass H, et al. Convalescent plasma in patients admitted to hospital with COVID-19 (RECOVERY): a randomised controlled, open-label, platform trial. *Lancet* [Internet]. 2021 May [cited 2021 Jun 5];397(10289):2049. Available from: </pmc/articles/PMC8121538/>
  17. Joyner MJ, Carter RE, Senefeld JW, Klassen SA, Mills JR, Johnson PW, et al. Convalescent Plasma Antibody Levels and the Risk of Death from Covid-19. *N Engl J Med* [Internet]. 2021 Mar 18 [cited 2021 Jun 13];384(11):1015–27. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa2031893>
  18. Libster R, Pérez Marc G, Wappner D, Coviello S, Bianchi A, Braem V, et al. Early High-Titer Plasma Therapy to Prevent Severe Covid-19 in Older Adults. *N Engl J Med* [Internet]. 2021 Feb 18 [cited 2021 Jun 13];384(7):610–8. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa2033700>
  19. Faraoni D, Schaefer ST. Randomized controlled trials vs. observational studies: Why not just live together? [Internet]. Vol. 16, *BMC Anesthesiology*. BioMed Central Ltd.; 2016 [cited 2021 Jun 16]. Available from: </pmc/articles/PMC5073487/>
  20. Klassen SA, Senefeld JW, Johnson PW, Carter RE, Wiggins CC, Shoham S, et al. The Effect of Convalescent Plasma Therapy on Mortality Among Patients With COVID-19: Systematic Review and Meta-analysis [Internet]. Vol. 96, *Mayo Clinic proceedings*. NLM (Medline); 2021 [cited 2021 Jun 9]. p. 1262–75. Available from: </pmc/articles/PMC7888247/>
  21. De Crescenzo F, Amato L, Cruciani F, Moynihan LP, D'Alò GL, Vecchi S, et al. Comparative Effectiveness of Pharmacological Interventions for Covid-19: A Systematic Review and Network Meta-Analysis. *Front Pharmacol* [Internet]. 2021 May 3 [cited 2021 Jun 5];12:649472. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34012398>

